

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005601

International filing date: 18 March 2005 (18.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: US
Number: 60/553,986
Filing date: 18 March 2004 (18.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 16 June 2005 (16.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

24.5.2005

PA 1294615

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

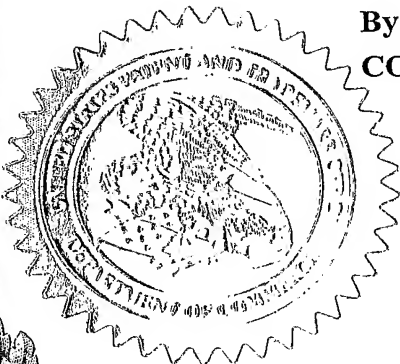
March 15, 2005

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 60/553,986

FILING DATE: March 18, 2004

By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS



A handwritten signature in dark ink, appearing to read "T. Lawrence", is written over the printed name.

T. LAWRENCE
Certifying Officer

PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT under 37 CFR 1.53(c).

INVENTOR(S)			
Given Name (first and middle [if any])	Family Name or Surname	Residence (City and either State or Foreign Country)	
Yukiko MASHIMA		Tokyo	JAPAN
<input type="checkbox"/> Additional inventors are being named on the _____ separately numbered sheet(s) attached hereto			
TITLE OF THE INVENTION (500 characters max) METHOD FOR DIAGNOSIS OF OPTIC NEUROPATHY			
CORRESPONDENCE ADDRESS Direct all correspondence to the address for SUGHRUE MION, PLLC filed under the Customer Number listed below: WASHINGTON OFFICE 23373 CUSTOMER NUMBER			
ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)			
<input checked="" type="checkbox"/> English and Japanese Language <input checked="" type="checkbox"/> Specification <input checked="" type="checkbox"/> Drawing(s) <input type="checkbox"/> Application Data Sheet. See 37 CFR 1.76	Number of Pages <u>64</u> Number of Sheets <u>3</u>	<input type="checkbox"/> CD(s), Number _____ <input checked="" type="checkbox"/> Other (specify) <u>16 sheets of tables</u>	
METHOD OF PAYMENT OF FILING FEES FOR THIS PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT			
<input type="checkbox"/> Applicant claims small entity status. See 37 CFR 1.27. <input checked="" type="checkbox"/> A check or money order is enclosed to cover the Provisional filing fees. The USPTO is directed and authorized to charge all required fees, except for the Issue Fee and the Publication Fee, to Deposit Account No. 19-4880. Please also credit any overpayments to said Deposit Account. <input type="checkbox"/> The USPTO is hereby authorized to charge the Provisional filing fees to our Deposit Account No. 19-4880. The USPTO is directed and authorized to charge all required fees, except for the Issue Fee and the Publication Fee, to Deposit Account No. 19-4880. Please also credit any overpayments to said Deposit Account.			FILING FEE AMOUNT (\$) \$160.00
The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government. <input checked="" type="checkbox"/> No. <input type="checkbox"/> Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____			

Respectfully submitted,

SIGNATURE Bruce E. KramerDATE March 18, 2004TYPED or PRINTED NAME Bruce E. KramerREGISTRATION NO. 33,725TELEPHONE NO. (202) 293-7060DOCKET NO. P80546

USE ONLY FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- ✓ BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

DESCRIPTION

METHOD FOR DIAGNOSIS OF OPTIC NEUROPATHY

5 TECHNICAL FIELD

The present invention relates to a method and kit for diagnosis of optic neuropathy.

BACKGROUND ART

Glaucoma is a major cause of blindness worldwide, and
10 estimated approximately 67 million persons suffered from some form of glaucoma. The majority of cases occur as late adult onset (typically over age 40 years) of primary open-angle glaucoma (POAG), which is the most common form of glaucoma and affects approximately 2% in white population and 7% of black
15 population over 40 years old. POAG results in a characteristic visual field changes corresponding to the excavation of the optic disc that is usually associated with an elevation of intraocular pressure (IOP). Normal-tension glaucoma (NTG) is a form of open-angle glaucoma in which typical glaucomatous
20 cupping of the optic nerve head and visual field loss are present but in which there is no evidence of increased IOP over 21 mm Hg at all times. In Japan, prevalence of glaucoma is approximately 3.5 % over 40 years old: POAG 0.58 % and NTG 2.04 %. Prevalence of NTG in Japanese population is high compared with
25 that in other populations. Glaucoma is a multifactorial

disorder characterized by a progressive optic neuropathy associated with a specific visual field loss, and results from the interaction of multiple genes and environmental influences, although intraocular pressure (IOP) is a major risk factor for
5 glaucoma.

Risk factors to develop glaucoma include high IOP, age, race, positive family history, myopia, the presence of diabetes or hypertension, and genetic factors. Although the exact pathogenesis of glaucomatous optic neuropathy is remains
10 unclear, it is generally accepted that an increased IOP is a major risk factor. Current treatment for glaucoma consists of interventions which lower IOP. However, in some patients with glaucoma, NTG or advanced stage of POAG, reduction of IOP does not prevent the progression of the disease, indicating that
15 factors other than an increased IOP may be involved in the development or progress of glaucoma.

POAG and NTG are a heterogeneous group of conditions probably with different multi-factorial etiologies resulting in the observed patterns of neuronal loss in the optic disk.
20 The association between glaucoma and the presence of many systemic vascular diseases including low systemic blood pressure, nocturnal dips in blood pressure, hypertension, migraine, vasospasm, and diabetes has been reported. The presence of optic disc hemorrhages in NTG patients suggests
25 that vascular insufficiencies are deeply involved in the

development and progression of NTG. A high percentage of patients with POAG receive a wide variety of medications for coexisting disorder. Especially, systemic hypertension was the most common disorder, occurring in 48% of the total population.

Glaucoma-like morphological changes have been reported in patients with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) at the atrophic stage and dominant optic atrophy (DAO). Recently, the inventor has reported optic disc excavation by a quantitative analysis using Heidelberg retinal tomography (HRT) in the atrophic stage of Japanese 15 patients with LHON harboring the 11778 mutation. LHON is a maternally-transmitted eye disease that mainly affects young adult men. Approximately 70% of patients were male. This disease usually causes severe and permanent loss of vision resulting in a visual acuity of less than 0.1. Visual field defects are present as central or cecocentral scotomas. So far more than 20 point mutations of mitochondrial DNA (mtDNA) have been reported in LHON patients worldwide, and more than 80% of LHON patients carry one of three mtDNA mutations at nucleotide position 3460, 11778, or 14484.

The major difference among LHON patients with one of these mtDNA mutations is in the clinical course. The 3460 and 14484 mutations are associated with better visual prognosis than the 11778 mutation which shows visual recovery rates of

only 4% to 7%. However, visual recovery has been documented in some patients with the 11778 mutation and an age of onset in the low teens. Recovery of vision appears to be more likely when visual deterioration begins at an early age, even in patients with the 11778 mutation.

The clinical variability of LHON patients, which includes age at onset, male predilection, incomplete penetrance, and visual recovery, suggests that the disease most likely results from polygenic or multifactorial mechanisms, possibly involving environmental stressors, X-chromosomal loci, and other mtDNA mutations. However, attempts to identify a relevant locus on the X-chromosome have not been successful. So-called "secondary LHON mutations" are more frequently found in European LHON patients than in unaffected Europeans and are polymorphisms linked to the European haplotype J. These polymorphisms are not strong autonomous risk factors.

Thus, the primary mutations are the major risk factors in LHON, but additional etiologic factors that augment or modulate the pathogenic phenotypes appear to be necessary. Considerable evidence indicates that heavy alcohol and/or tobacco use increases the risk of optic neuropathy in LHON families, although one study did not find this association. Possible secondary genetic interactions are complex and not firmly established.

【発明の開示】

本発明者は、視神経症、特に緑内障およびレーベル病を発症する危険因子を検出可能な危険遺伝子を鋭意検討の結果、視神経症の発症との関連性の高いいくつかの遺伝子多型を見出した。

- 5 即ち、本発明は、生体試料において、以下に示す遺伝子多型のうち、いずれか少なくとも1つを解析する工程を含む、生体試料の遺伝子多型の検出方法に関する。

(1) エンドセリン遺伝子：コドン番号198位がリジンまたはアスパラギン

(2) EDN1 (エンドセリン1) 遺伝子：塩基番号-1370位がチミンまたはグア

10 ニン

(3) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子：塩基番号70位がシトシンまたはグアニン

(4) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子：塩基番号1222位がシトシンまたはチミン

- 15 (5) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子：コドン番号323位のヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン

(6) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号9099位がシトシンまたはアデニン

(7) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号9101位がチミンまたはグアニン

(8) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号9101位がチミンまたはシトシン

- 20 (9) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号9804位がグアニンまたはアデニン

(10) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号11778位がグアニンからアデニン

(11) AT1 (アンギオテンシンII受容体1) 遺伝子：塩基番号-713位がチミンまたはグアニン

(12) AT1 (アンギオテンシンII受容体1) 遺伝子：塩基番号-521位がシ

25 トシンまたはチミン

- (13) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン
- (14) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 1359 位がグアニンまたはアデニン
- 5 (15) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 385 位がシトシンまたはアデニン
- (16) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン
- (17) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン
- 10 (18) CACNA1A (カルシウムチャンネル $\alpha 1A$) 遺伝子多型
- (19) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 α 2) 遺伝子多型
- (20) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子: 塩基番号 190 位がグアニンまたはシトシン
- 15 (21) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子: 塩基番号 677 位がシトシンまたはチミン
- (22) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシンまたはアルギニン
- (23) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステインまたはセリン
- 20 (24) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領域における 1G/2G
- (25) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306 位がシトシンまたはチミン
- 25 (26) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領域

域における 5A/6A

(27) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリン
またはグリシン

5 (28) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリ
シンまたはアルギニン

(29) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギ
ニンまたはグリシン

(30) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレ
オニンまたはイソロイシン

10 (31) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイ
シン

(32) オプチニューリン (OPTN) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまた
はアデニン

(33) TP53 遺伝子: コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン

15 (34) ミクロゾーム型エポキシドヒドラーゼ (EPHX1) 遺伝子: コドン番号
113 位がチロシンまたはヒスチジン

また、本発明は、以下の工程 [I] から [III] を含む、視神経症の診断方法
に関する。

[I] 生体試料において、以下に示す遺伝子多型のうち、いずれか少なくとも 1

20 つを解析する工程

(1) エンドセリン遺伝子: コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン

(2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: 塩基番号 -1370 位がチミンまたはグア
ニン

(3) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子: 塩基番号 70 位がシトシンまた
25 はグアニン

- (4) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子: 塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン
- (5) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子: コドン番号 323 位がヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン
- 5 (6) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン
- (7) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン
- (8) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン
- (9) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン
- (10) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン
- 10 (11) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-713 位がチミンまたはグアニン
- (12) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-521 位がシトシンまたはチミン
- (13) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン
- 15 (14) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 1359 位がグアニンまたはアデニン
- (15) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 385 位がシトシンまたはアデニン
- 20 (16) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン
- (17) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン
- (18) CACNA1A (カルシウムチャンネル $\alpha 1A$) 遺伝子多型
- 25 (19) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 α 2) 遺伝子多型

- (20) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子: 塩基番号 190
位がグアニンまたはシトシン
- (21) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子: 塩基番号 677
位がシトシンまたはチミン
- 5 (22) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシン
またはアルギニン
- (23) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステイ
ンまたはセリン
- (24) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領
10 域における 1G/2G
- (25) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306
位がシトシンまたはチミン
- (26) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領
域における 5A/6A
- 15 (27) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリン
またはグリシン
- (28) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリ
シンまたはアルギニン
- (29) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギ
20 ニンまたはグリシン
- (30) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレ
オニンまたはイソロイシン
- (31) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイ
シン
- 25 (32) オプチニューリン (OPTN) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまた

はアデニン

(33) TP53 遺伝子：コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン

(34) ミクロゾーム型エポキシドヒドラーゼ (EPHX1) 遺伝子：コドン番号
113 位がチロシンまたはヒスチジン

5 [I I] 前記工程によって得られる遺伝子多型情報から生体試料の遺伝子型を
決定する工程、および

[I I I] 決定された遺伝子型から視神経症の遺伝的リスクを求める工程。

本発明は、特に前記工程 [I] において (1) ~ (32) のいずれか少なくとも
も 1 つの遺伝子多型を解析することを特徴とする緑内障の診断方法、または (3
10 3) ~ (34) のいずれか少なくとも 1 つの遺伝子多型を解析することを特徴
とするレーベル病の診断方法に関する。

【発明の実施形態】

本発明において、「C9099A」等の表記は、遺伝子の塩基置換（ヌクレオチド
置換）を示し、具体的には遺伝子の塩基番号 9099 位のシトシン (C) がアデニ
15 ン (A) に変異していることを意味する。またこれは、塩基番号 9099 位にシト
シン (C) またはアデニン (A) を有する遺伝子多型が存在することを示すもの
でもある。

本発明において、「Gln192Arg」等の表記は、遺伝子の塩基置換に伴うアミ
ノ酸置換を示し、具体的にはタンパクのコドン番号（アミノ酸番号）192 位の
20 グリシン (Gln) がアルギニン (Arg) に変異していることを意味する。また
はこれは、コドン番号 192 位にグリシン (Gln) またはアルギニン (Arg) を
有するタンパク多型が存在することを示すものでもある。

本発明において、「遺伝子多型」とは、遺伝子中のある部位において、ヒトに
よって 2 種以上の塩基が存在することをいい、いわゆる単一ヌクレオチド多型
25 (single nucleotide polymorphism: SNP) および複数ヌクレオチドから

なる配列にわたる多型の両方を含む。遺伝子多型は遺伝子の発現や活性における変化を結果として生じないものであっても、あるいは遺伝子の発現や活性における変化を結果として生じるものであっても良い。また、遺伝子の塩基配列が野生型（正常遺伝子の塩基配列）には存在しない場合、遺伝子変異というが、

5 遺伝子変異も本発明の遺伝子多型に含まれる。

本発明において、遺伝子多型の検出は、遺伝子多型ごとに、または複数もしくは全部同時に行ってもよい。また、検出に用いられる遺伝子多型は、本発明にて視神経症との関連が新規に見出された遺伝子多型に加えて、従来から視神経症との関連が知られている公知の遺伝子多型を含めて行ってもよい。複数の

10 遺伝子多型を用いることで、視神経症の診断確率をより高めることが可能となる。

本発明において、遺伝子多型を検出する方法は特に限定されるものでなく、通常公知の方法を用いることができる。代表的な検出方法としては、PCR-RFLP法（制限酵素切断断片長多型解析）、PCR-SSCP法（一本鎖DNA高次構造多型解析）、ASOハイブリダイゼーション法、ダイレクトシーケン

15 A高次構造多型解析）、ARMS法、DGGE法、RNaseA切断法、化学切断法、DPL法、TaqMan PCR法、インベーター法、MALDI-TOF/MS法、TDI法、一塩基伸長法、WAVE法、一分子蛍光検出法などが挙げられる。本発明の方法においては、これらの検出方法は単独で用いても、任意に組み合わせ

20 て用いてもよい。

本発明において、遺伝子多型の検出に供される生体試料は特に限定されるものではなく、例えば、毛髪、血液、唾液、リンパ液、気道粘液、培養細胞、尿などから得ることができる。

本発明において、「診断」とは、発症の診断のみならず、発症を早める危険因

25 子および病態を進行させる危険因子の診断も含まれる。

本発明は、本発明の検出方法または診断方法に使用されるキット（遺伝子あるいはタンパク多型検出用キット、または視神経症診断用キット）を提供する。該キットには、先述の（１）～（３４）の多型からなるグループより選択される一つ以上の遺伝子多型を検出または解析するための遺伝子プライマーやプローブ、またはタンパク多型を検出または解析するための抗体などが含まれる。

本発明において、「プライマー」とは、ヌクレオチドの複製を行う際必要な、複製開始点となる相補的ヌクレオチド断片を意味し、「プローブ」とは、組換えDNA実験で目的遺伝子を探り出すためのDNA、RNAの断片を意味する。プライマーまたはプローブは、目的の遺伝子多型が存在する部位またはその周辺の配列に特異性を有するものであって、他の遺伝子と同じでなければ（例えば、繰り返し配列やパリンドローム配列でないことなどが必要）特に制限されず、DNA合成の態様、合成するDNAの領域および塩基長などに応じて適宜選択することができる。本発明のプライマーまたはプローブは、DNA自動合成等の公知の方法を利用して本発明で開示する塩基配列に従って合成することができる。

【発明の効果】

本発明によれば、視神経症（特に緑内障、レーベル病など）に関連する遺伝子多型が解析され、生体試料の遺伝子型が検出される。この遺伝子型の検出によって得られる多型情報を用いることにより、該疾患のリスク診断を行うことが可能となる。

また、視神経症と関連の高いいくつかの遺伝子多型を用いた解析を組み合わせることによって、信頼性が高く、高精度で予知確率の高いリスク診断することが可能となる。

例えば、開放隅角緑内障の原因遺伝子として、現在ミオシリン、オブチニューリンの遺伝子変異の２つが明らかになっているが、他にも４つ染色体上にそ

の存在が知られている。これら公知の変異遺伝子と本発明で緑内障との関連が明らかとなった遺伝子多型（変異を含む）を持てば、ほぼ100%緑内障を発症することが予測されるので、発症前診断として有効である。

さらに、人種や性別において視神経症との関連性が認められたSNPについては、その遺伝子多型を単独で解析することによっても、極めて高い確率でリスク診断することが可能となる。

また、得られた遺伝子多型情報に基づき、統計学的な解析を行うことによって、発症年齢の予測、生活習慣病の関与の予測、症候因子の関与の予測、点眼剤や内服剤の反応性の予測を行うことが可能となる。したがって、発症前診断による早期発見により、危険因子の除去（生活、環境改善の改善の指導）および早期治療（変異遺伝子の除去、遺伝子に基づく適切な治療の開始）などを行うことが可能となり、患者の症状に応じたオーダーメイド医療によって失明率を低下することが可能となる。

早期治療としては、例えば、本発明の診断方法を実施した結果、解析対象の多型が視神経症の発症リスクを高める遺伝子型であった場合に、発症リスクの低い遺伝子型を有する遺伝子を生体内に導入して発現させれば、当該遺伝子が発現することによって症状の軽減、発症の抑制、発症リスクの軽減などを期待できる。また、発症リスクの高い遺伝子型を有する遺伝子のmRNAに対するアンチセンス鎖を導入するか、RNAi法を用いることによって、当該mRNAの発現を抑制する方法によっても、同様の治療効果が期待される。

また、原因遺伝子がどのように視神経症の発症に関与しているかの解析により、視神経症の原因解明が可能となり、病態生理に基づいた新たな治療薬の開発が可能となる。

さらに、本発明の診断対象である視神経症の遺伝子多型情報と内科領域で行われると考えられる生活習慣病の疾患遺伝子多型情報を組み合わせることによ

って、総合的な内科診断を、生活習慣病や高齢者の加齢に伴う疾患の総合的な
リスク診断に役立てることが可能になり、質の高い QOL (Quality of life)
に役立てることが可能となる。

以下、本発明を試験例によりさらに詳細に説明するが、これは本発明の範囲
5 を限定するものではない。

EXAMPLE 1 Polymorphic Variants of Genes Associated with Apoptosis and Oxidative Stress in Leber's Hereditary Optic Neuropathy

10

Purpose: To determine whether genetic polymorphisms for
oxidative stress and apoptosis cause the clinical variability
in patients with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON).

MATERIALS AND METHODS

15 **Patients**

We studied 86 unrelated Japanese patients with LHON
carrying the 11778 mutation with homoplasmy. Their mtDNA
mutation was confirmed by polymerase chain reaction followed
by a restriction-enzyme assay which revealed concordant gain
20 of an MaeIII site.

The mean age at the onset of visual loss in 86 LHON
patients was 25.1 ± 13.0 years with a range 3 to 65 years.

Genomic DNA Extraction and Genotyping

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by
25 the SDS-proteinase K and phenol/chloroform extraction method.

Polymorphisms were examined in the oxidative stress-related gene, microsomal epoxide hydrolase (EPHX1), and the apoptosis-related gene, TP53.

Each polymorphism was identified using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) techniques (Table 1).

Table 1. Primer sequences, product size, and annealing temperatures

Gene	Primer sequences	Product Size (bp)	Annealing Temperature (°C)	Restriction Enzyme
TP53	F TTG CCG TCC CAA GCA ATG GAT GA	199	60.0	Acc II
	R TCT GGG AAG GGA CAG AAG ATG AC			
EPHX1	F GAT CGA TAA GTT CCG TTT CAC C	165	56.0	EcoR V
	R TCA ATC TTA GTC TTG AAG TGA GGA T			

RESULTS

The associations between age at onset and the polymorphisms were presented in Table 2-1 and Table 2-2.

Table 2-1. Association between age at onset and TP53 (Arg72Pro) and EPHX1 (Tyr113His) gene polymorphism in Leber's hereditary optic neuropathy

Gene	Genotype		P
TP53 (Arg72Pro)	Arg/Arg	Arg/Pro + Pro/Pro	0.009
Age at onset	20.7±10.6 (n=35)	28.1±13.8 (n=51)	
EPHX1 (Tyr113His)	Tyr/Tyr + Tyr/His	His/His	0.038
Age at onset	27.9±13.9 (n=45)	22.1±11.4 (n=41)	

P Value for t-test

Table 2-2. Association between age at onset and TP53 (Arg/Arg) and EPHX1 (His/His) gene polymorphism in Leber's hereditary optic neuropathy

Group 1	Group 2	Group 3	P
Arg/Arg and His/His	Arg/Arg or His/His	others	
17.7±9.3 (n=19)	25.3±11.3 (n=38)	29.8±15.1 (n=29)	0.0044

P value for Kruskal-Wallis

Group 1: Patients who have Arg/Arg at codon 72 in TP53 and His/His at codon 113 in EPHX1

Group 2: Patients who have Arg/Arg at codon 72 in TP53 but not His/His at codon 113 in EPHX1, or His/His at codon 113 in EPHX1 but not Arg/Arg at codon 72 in TP53

Group 3: Patients other than Groups 1 and 2

As shown in Table 2-1, the codon 72 genotype in TP53 and the codon 113 genotype in EPHX1 were significantly associated with younger age at onset of Leber's hereditary optic neuropathy.

As shown in Table 2-2, the co-existence of the Codon 72 genotype in TP53 and the codon 113 genotype in EPHX1 were significantly associated with younger age at onset of Leber's hereditary optic neuropathy.

These results indicated that detection of the Arg/Arg homozygote in TP53 and His/His homozygote in EPHX1 make possible the early diagnosis and early treatment of Leber's hereditary optic neuropathy.

These results also indicated that the Codon 72 polymorphism may interact with mitochondrial dysfunction to influence disease expression. Individual variations may exist in the apoptotic response that is correlated with the polymorphism at codon 72 of p53. Bonafe et al (Biochem Biophys Res Commun 2002;299:539-541.) reported that cultured cells

from healthy subjects carrying the Arg/Arg genotype underwent more extensive apoptosis than cells from Arg/Pro subjects in response to the cytotoxic drug cytosine arabinoside. Thus, naturally occurring genetic variability at the p53 gene could partly explain individual differences in *in vivo* susceptibility of cells to a chemotherapeutic drug. Dumoulin et al (Nat Genet 2003;33:357-365). reported that the Arg72 variant was more efficient than the Pro72 variant at inducing apoptosis, with at least one mechanism underlying this greater efficiency being enhanced localization of Arg72 variant to mitochondria in tumor cells. The synthetic p53 inhibitors might be highly effective in treating LHON in which neurons died by apoptosis triggered by mitochondrial impairment and oxidative stress.

Example 2 Mitochondrial DNA mutations related with Leber's hereditary optic neuropathy in primary open-angle glaucoma and normal-tension glaucoma

Materials and Methods

Patients

A total of 651 blood samples were collected at seven institutions in Japan. There were 201 POAG patients, 232 NTG patients, and 218 normal controls, and none of the subjects was related to others in this study.

The mean age at the time of examination was 61.2 ± 16.0 years in POAG, 58.8 ± 13.6 years in NTG, and 70.6 ± 10.9 years in the control subjects. The mean age of the control subjects was significantly older than that of POAG patients ($P < 0.001$) and the NTG patients ($P < 0.001$). We purposely selected older control subjects to reduce the probability that a subset of them would eventually develop glaucoma. There were 112 (55.7%) men in the POAG group, 108 (46.6%) in the NTG group, and 89 (40.8%) in the control group.

Patients were considered to have POAG if they had a normal open-angle, a cup-disc ratio greater than 0.7 with typical glaucomatous visual field loss on either Goldmann or Humphrey perimetry, and the absence of ocular, rhinologic, neurological, or systemic disorders which might be responsible for the optic nerve damage. Patients with NTG had an IOP of 21 mmHg or lower. Patients with exfoliative glaucoma, pigmentary glaucoma, and corticosteroid-induced glaucoma were excluded.

Two-hundred-eighteen control samples were obtained from Japanese subjects who had no known eye abnormalities except for cataracts. These subjects were older than 40 years, had IOPs below 21 mm Hg, had normal optic discs, and no family history of glaucoma.

Detection of mtDNA Mutations by Invader[®] Assay

Genomic DNA was isolated from peripheral blood

lymphocytes by standard methods of phenol-chloroform extraction.

The primary probes (wild and mutant probes) and Invader[®] oligonucleotides (Invader[®] probe) used to detect the six mtDNA mutations (G3460A, T9101C, G9804A, G11778A, T14484C, and T14498C) by the Invader[®] assay are shown in Table 3.

Table 3 The oligonucleotide sequence of wild type, mutant, and Invader probes with Invader assay to detect mutations of mtDNA

Nucleotide	Target	Probe	Sequence	Tm	Dye
10	G3460A	Anti-sense	Wild ACGGACCGCGAGgccataaaactctttcacca	63.2	RED
		Mutant	CGCGCGAGGaccataaaactctttcaccaaa	63.3	FAM
		Invader	ccctacgggctactacaacccttcgctgact	77.7	
	T9101C	sense	Wild CGCGCGAGGatgataagtgtagaggggaag	64.1	FAM
		Mutant	ACCGACCGCGAGgtgataagtgtagaggggaag	62.2	RED
		Invader	ggcgacagcgattttctaggatagtcagttagaattagaattgtgaagT	76.8	
	G9804A	anti-sense	Wild ACGGACCGCGAGgccacaggcttcca	63.7	FAM
		Mutant	CGCGCGAGGaccacaggcttccac	63.7	RED
		Invader	catttcgacggcatctacggctcaacattttttgtat	76.7	
	G11778A	Anti-sense	Wild ACGGACCGCGAGgcatcataatcctctctcaag	63.5	RED
		Mutant	CGCGCGAGGacatcataatcctctctcaag	62.2	FAM
		Invader	gcctagcaaaactcaaactacgaacgcactcacagtct	77.7	
15	T14484C	Sense	Wild CGCGCGAGGatggttggtcttttgatatactac	63.4	FAM
		Mutant	ACCGACCGCGAGgtggttggtcttttgatatactac	62.8	RED
		Invader	ttttgggggaggttatatgggtttaatagtttttttaattatttagggggaatgt	76.0	
	T14498C	sense	Wild CGCGCGAGGatttagggggaatgatggt	64.0	FAM
		Mutant	ACCGACCGCGAGgttagggggaatgatggt	62.7	RED
		Invader	tgttattattctgaattttgggggaggttatatgggtttaatagtttttttaattttT	74.1	

Invader[®] assay FRET-detection 256-well plates (Third Wave Technologies, Inc, Madison, WI) contains the generic components of an Invader[®] assay (Cleavase[®] enzyme VIII, FRET probes, MOPS buffer, and polyethylene glycol) dried in each of the individual wells. The biplex format of the Invader[®] assay enabled simultaneous detection of two DNA sequences in a single well.

The detail method was described previously. In brief, 8 µl of the primary probe/Invader[®]/mixture and total DNA (10 ng) samples were added to each well of a 96-well plate, and were denatured by incubation at 95° C for 10 min. After 15 µl of mineral oil (Sigma, St. Louis, MO) was overlaid on all reaction wells, the plate was incubated isothermally at 63° C for 2 hours in a PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA) and then kept at 4° C until fluorescence measurements. The fluorescence intensities were measured on a CytoFlour 4000 fluorescence plate reader (Applied Biosystems, Foster City, CA) with excitation at 485 nm/20 nm (wavelength/ bandwidth) and emission at 530 nm/25 nm for FAM dye; excitation at 560 nm/20 nm and emission at 620 nm/40 nm for Redmond RED (RED) dye. Each samples was tested in duplicate in the same plate and two fluorescence measurements were performed in each plate. Thus, four measurements were obtained for each sample and they were averaged.

Direct DNA Sequencing

To detect mutations by direct sequencing, the PCR products were first purified with the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valenica, CA, USA) to remove unreacted primers and precursors. The sequencing reactions were then performed using the ABI PRISM BigDye Terminator (v.3.1) Cycle Sequencing Kit, according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). The data were collected by the

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer and analyzed by the ABI PRISM sequencing analysis program (v.3.7).

Table 4. Primer sequences

mutation		Primer Sequences (5' to 3')
3460	F	CAG TCA GAG GTT CAA TTC CTC
	R	TGG GGA GGG GGG TTC ATA GTA
11778	F	GGC GCA GTC ATT CTC ATA AT
	R	AAG TAG GAG AGT GAT ATT TG
14484	F	無し
	R	GCT TTG TTT CTG TTG AGT GT
9101	F	AAA ATG CCC TAG CCC ACT TC
	R	GTC ATT ATG TGT TGT CGT GC
9804	F	CAC ATC CGT ATT ACT CGC AT
	R	CGG ATG AAG CAG ATA GTG AG

RESULTS

A total of 651 Japanese subjects were studied. When a nucleotide substitution is located within a primary probe or an invader probe, the examined cases showed no reaction to both probes by Invader assay. In such cases, direct sequence analysis showed single nucleotide polymorphisms (SNPs) at the nucleotide position of 9099, 9101, 9102, 9797, and 9815.

As shown in Table 5, 7 patients including 5 females and 2 males harbored 5 mutations of mtDNA, and have not developed LHON. Two patients (Cases 1 and 2) harbored novel amino acid changes which have not been to associated with LHON, and 5 patients (Cases 3 to 7) harbored LHON mutations.

These mtDNA mutations were not detected in normal controls.

Table 5.

Case	mtDNA mutation	Patient
1	C9099A mutation (Ile to Met)	POAG (Male)
2	T9101G mutation (Ile to Ser)	POAG (Female)
3	T9101C mutation (Ile to Thr)	POAG (Female)
4	G9804A mutation (Ala to Thr)	POAG (Male)
5	G9804A mutation (Ala to Thr)	NTG (Female)
6	G11778A mutation (Arg to His) heteroplasmy 80%	POAG (Female)
7	G11778A mutation (Arg to His) heteroplasmy 15%	NTG (Male)

As described above, we found 5 mtDNA mutations including 2 novel mtDNA mutations in glaucoma patients. These results indicated that mtDNA mutations is one of the risk factor to develop or progress the glaucoma, and detection of the mtDNA mutations makes possible the early diagnosis and early treatment of glaucoma.

Example 3 Gene polymorphisms of the renin-angiotensin aldosterone system associate with risk for developing primary open-angle glaucoma and normal-tension glaucoma

Purpose: Multiple environmental and genetic factors may be involved in pathogenesis of glaucoma. To predict genetic risk of glaucoma, an association study in gene polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone (R-A-A) system was performed.

MATERIALS and METHODS

Patients and Control study subjects

A total of 551 blood samples were collected at seven institutes in Japan. They were 162 POAG patients, 193 NTG patients, and 196 normal subjects, and none of the subjects was related to others in this study.

The average age at examination was 58.8 ± 13.7 years in NTG, 62.0 ± 15.4 years in POAG, and 71.2 ± 10.4 years in normal subjects. The average age of the normal control subjects is significantly higher than NTG patients ($p < 0.001$) or POAG patients ($p < 0.001$), respectively. This could reduce the possibility that a subset will eventually develop glaucoma. The familial history was recorded in 66 (34.2%) out of 127 NTG patients and 49 (30.2%) out of 113 POAG patients. Male patients were 89 (46.1%) in NTG and 87 (53.7%) in POAG, and 77 (39.3%) in normal subjects.

One hundred ninety-six Japanese control samples were obtained from individuals who had no known eye abnormalities except cataract. These subjects were older than 40 years with IOP below 21 mmHg, no glaucomatous disc change, and no family history of glaucoma.

Genotyping

Seven genes and 10 polymorphisms in the R-A-A system were determined for each subject with glaucoma or normal Japanese control with renin (REN) I8-83G>A, angiotensin II

type 1 receptor (AT1R) 1166A>C, -521C>T, -713T>G, angiotensin II type 2 receptor (AT2R) 3123C>A, cytochrome P45011B1 (CYP11B1) -344T>C, and chymase (CYM) 3123C>A, were identified using by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The angiotensin-converting enzyme (ACE) insertion/deletion (I/D) was determined only by PCR and agarose gel electrophoresis. To avoid the false determination of ACE/ID polymorphism, I allele specific amplification was carried out following the protocol of Lindpaintner et al (N Engl J Med 1995; 332: 706-711). Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by phenol-chloroform extraction. The primer sets and restriction enzymes used were listed in Table 6.

Table 6. Primer pair sequences used for PCR amplification and restriction enzymes of polymorphic sites in renin angiotensin system

Gene	Polymorphism	Primer sequences	Annealing temp	Product size	Restriction enzyme	Digested products
REN	I8-83G>A	TGAGGTTTCGAGTCGGCCCCCT TCGCCAACAATGGCCACACAT	68°C	250bp	MboI	G: 250bp A: 171+79bp
ACE	I/D 1st step	GCCTTCGAGGTGTCTGCAGCATGT GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC	63°C	D: 319bp I: 597bp		
	2nd step	TGGCAGCACAGCGCCCGCCACTAC TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA	67°C	D/D: no product I: 335bp		
AT1	1166A>C	GAGGTTGAGTGACATGTTGAAAC CGTCATCTGTCTAATGCAAAATGT	60°C	253bp	DdeI	A: 253bp C: 155+98bp
	-521C>T	CGTGATGTCTTTATCTGGTTTGG CGAAGTTTGGTAATACAGTGTGG	60°C	270bp	SspI	C: 270bp T: 144+126bp
	-713T>G	AAACTACAGTCACCTACTCACCT TTCTTCACAACTCTTCCAA	55°C	292bp	HinfI	T: 170+122bp G: 292bp
AT2	3123C>A	GGATTTCAGATTCTCTTTGAA GCATAGGAGTATGATTTAATC	53°C	340bp	AluI	C: 340bp A: 227+113bp
CYP11B1	-344C>T	CAGGAGGGATGAGCAGGCAGAGCACAG CTCACCAGGAACCTGCTCTGGAAACATA	63°C	404 bp	HaeIII	C: 333bp + 71bp T: 404 bp
CMA	-1903A>G	GGAAATGTGAGCAGATAGTCCAGTC AATCCGGAGCTGGAGAACTCTTGTC	51°C	285bp	BstXI	A: 285bp G: 195+90bp

The genotyping angiotensinogen (AGT) T174M, M235T was determined using by Invader assay®.

RESULTS

Genotype distribution of R-A-A system in Japanese population

5 Of 10 polymorphisms in R-A-A system, three showed a significantly difference in frequencies of genotypes: REN/I8-83G>A for POAG, AT1/-713T>G for POAG, and AT2/3123C>A for NTG (Table 7). A 3123C>A polymorphism was associated with only female patients with NTG.

10 A frequency of homozygous G genotype (GG) in AT1/-713T>G polymorphism was significantly higher ($p=0.04$ for TT+TG v GG) in POAG patients (4.2%) than in controls (0.5%). And a frequency of homozygous A genotype (AA) in REN/I8-83G>A polymorphism was significantly lower ($p=0.031$ for GG+GA v AA) in POAG patients
15 (0.7%) than in controls (5.5%). A frequency of CA+AA genotypes in AT2/3123C>A polymorphism was significantly higher ($p=0.011$ for CC v CA+AA) in female patients with NTG (70.8%) than in female controls (55.0%).

Table 7. Association between glaucoma (POAG and NTG) and gene polymorphism of the renin-angiotensin aldosterone system.

Gene	Gene Polymorphism		Genotype Frequency		p
			GG+GA	AA	
Renin	I8-83G>A	POAG (n=153)	152 (99.3%)	1 (0.7%)	0.031
		NTG (n=185)	177 (95.7%)	8 (4.3%)	
		Control (n=183)	173 (94.5%)	10 (5.5%)	
AT1	-713T>G		TT+TG	GG	p
		POAG (n=165)	158 (95.8%)	7 (4.2%)	0.04
		NTG (n=208)	208 (100%)	0 (0.0%)	
		Control (n=198)	197 (99.5%)	1 (0.5%)	
AT2	3123C>A (Female)		CC	CA+AA	p
		POAG (n=79)	34 (43.0%)	45 (56.0%)	0.011
		NTG (n=120)	35 (29.2%)	85 (70.8%)	
		Control (n=111)	54 (45.0%)	66 (55.0%)	

Association between two promoter polymorphisms in AT1 in POAG patients

A frequency of POAG carriers with combined homozygous -521T and homozygous -713G (4.2%) was significantly higher (p=0.011) than that of normals (0%) (Table 8). Only POAG patients, neither NTG nor normal subjects, had this genotype.

Table 8. Distribution of genotypes of AT1 -521T allele and -713G allele

Group	A	B	P
POAG (n=165)	7 (4.2%)	158 (95.8%)	0.011
NTG (n=208)	0 (0.0%)	208 (100.0%)	
Control (N=198)	0 (0.0%)	198 (100.0%)	

A: Subjects with two -521 alleles and two -713G alleles

B: Subjects not satisfying the criteria for Group A.

These results indicated that gene polymorphism of the renin-angiotensin aldosterone system is one of important genetic risk factors for development of glaucoma. Detection of the REN/I8-83G>A and AT1/-731T>G polymorphisms make possible the early diagnosis and early treatment of POAG. Especially, specific genotype of combined homozygous -521T and homozygous -713G in the AT1 gene is useful for the early diagnosis of POAG. Detection of the AT2/3123C>A polymorphisms make possible the early diagnosis and early treatment of female patient with NTG.

Example 4 Gene polymorphisms of the Endothelin gene associate with risk for developing normal-tension glaucoma

Methods

Patients

A total of 605 blood samples were collected. There were

178 POAG patients, 214 NTG patients, and 213 normal controls, and none of the subjects was related to others in this study. Patients were considered to have POAG if they had a normal open-angle, a cup-disc ratio greater than 0.7 with typical
5 glaucomatous visual field loss on either Goldmann or Humphrey perimetry, and the absence of ocular, rhinologic, neurological or systemic disorders which might be responsible for the optic nerve damage. Patients with NTG had an IOP of 21 mmHg or lower. Patients with exfoliative glaucoma, pigmentary glaucoma, and
10 corticosteroid-induced glaucoma were excluded. Control samples were obtained from Japanese subjects who had no known eye abnormalities except for cataracts. These subjects had IOPs below 21 mm Hg, had normal optic discs, and no family history of glaucoma.

15 **Detection of G/T polymorphism of endothelin (ET) gene by Invader assay**

DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by standard methods of phenol-chloroform extraction, and G/T polymorphism (Lys/Lys, Lys/Asn and Asn/Asn) at codon 198 in
20 exon 5 of ET gene was determined by the Invader® assay. The primary probes (wild and mutant probes) and Invader® oligonucleotides (Invader® probe) used to detect the G/T polymorphism of ET gene are shown in Table 9.

Table 9.

Mutation	nucleotide change	Target	Probe	Sequence	T _m	Dye
EDN Ex5 GT	G to T	Sense	Wild	cgcgcgcgaggCTTGCCTTCAGCTTGG	64.6	FAM
			Mutant	acggacgcggagATTGCCCTTCAGCTTGG	64.0	RED
			Invader	GTTGTGGGTCACATAACGCTCTCTGGAGGGT	76.9	

5 Invader® assay FRET-detection 96-well plates (Third
Wave Technologies, Inc, Madison, WI) contains the generic
components of an Invader® assay (Cleavase® enzyme VIII, FRET
probes, MOPS buffer, and polyethylene glycol) dried in each
of the individual wells. The detail method was described
10 previously. In brief, 8 µl of the primary
probe/Invader®/mixture and total DNA (10 ng) samples were added
to each well of a 96-well plate, and were denatured by
incubation at 95°C for 10 min. After 15 µl of mineral oil (Sigma,
St. Louis, MO) was overlaid on all reaction wells, the plate
15 was incubated isothermally at 63° C for 2 hours in a PTC-100
thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA) and then kept at 4°
C until fluorescence measurements. The fluorescence
intensities were measured on a CytoFlour 4000 fluorescence
plate reader (Applied Biosystems, Foster City, CA) with
20 excitation at 485 nm/20 nm (wavelength/ bandwidth) and
emission at 530 nm/25 nm for FAM dye; excitation at 560 nm/20
nm and emission at 620 nm/40 nm for Redmond RED (RED) dye. Each
sample was tested in duplicate in the same plate and two
fluorescence measurements were performed in each plate. Thus,
25 four measurements were obtained for each sample and they were

averaged.

Results

The genotype frequencies of G/T polymorphism (Lys/lys, Lys/Asn and Asn/Asn) at codon 198 in exon 5 of ET gene are presented in Table 10.

Table 10. The genotype frequency at codon 198 in exon 5 of ET gene

Group	n	Genotype Frequency			P	Genotype Frequency		P
		Lys/lys	Lys/Asn	Asn/Asn		Lys/lys	Lys/Asn + Asn/Asn	
Control	213	94 (44.1%)	93 (43.7%)	26 (12.2%)		94 (44.1%)	119 (55.9%)	
NTG	214	120 (56.1%)	72 (33.6%)	22 (10.3%)	0.046	120 (56.1%)	94 (43.9%)	0.014
POAG	178	82 (46.1%)	77 (43.3%)	19 (10.7%)		82 (46.1%)	96 (53.9%)	

These results indicated that Lys/Lys homozygote of ET-1 gene at codon 198 in exon 5 is one of the risk factor to develop or progress the NTG, and detection of the Lys/Lys homozygote makes possible the early diagnosis and early treatment of NTG.

Example 5 Novel MYOC Gene Mutation, Phe369Leu, in Japanese Patients with Primary Open-angle Glaucoma Detected by Denaturing High-performance Liquid Chromatography

Purpose: To screen for mutations in the MYOC gene in Japanese patients with primary open-angle glaucoma (POAG) using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC).

Materials and Methods

Patients

Blood samples were collected from 171 POAG patients and 100 normal subjects at seven Japanese medical institutions.

5 The subjects were unrelated, and their mean age at the time of examination was 55.1 ± 16.0 (\pm standard deviation) years for the patients with POAG and 70.5 ± 10.6 years for the normal subjects. We purposely selected older control subjects to reduce the probability that a subset of them would develop
10 glaucoma.

A detailed family history was obtained by interviews in 55 POAG patients (32.2%). There were 91 men (53.2%) in the POAG patients, and 41 men (41.0%) in the normal subjects.

DNA Extraction and PCR Conditions

15 Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by standard methods. The seven exonic regions of the MYOC gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primer sets listed in Table 11. For high-throughput analysis of the patients, samples from three patients were
20 pooled. The PCR reaction was performed with a thermal cycler (iCycler; Bio Rad, Hercules, CA) in a total volume of 25 μ l. The PCR conditions were: denaturation at 95° C for 9 min; followed by 35 cycles at 95° C for 1 min; 58° C for 30 sec (Table 1); and 72° C for 1.5 min; a final extension step was then carried
25 out at 72° C for 7 min. For heteroduplex formation, each PCR

product (25 µl) was denatured at 95° C for 5 min and gradually cooled to 25° C.

For analyses of a few samples, each of seven exonic regions was amplified simultaneously by PCR in a 96-well plate (96-well Multiplate, MLP-9601; MJ Research, Waltham, MA). Seven wells were used for each patient. Primer sets were designed to be effective using a single annealing temperature of 58° C (Table 11).

Table 11. Primer sequences, product size, and PCR annealing and DHPLC analysis temperatures

Exon		Primer sequences (5' to 3')	Product size (bp)	PCR T _m (°C)	DHPLC T _m (°C)
1A	F	AGC ACA GCA GAG CTT TCG AGA GGA	302	58.0	61.9
	R	CTC CAG GTC TAA GCG TTG G			
1B	F	CAG GCG ATG TCA GTC ATC CA	298	58.0	61.2, 64.5
	R	TCT CAT TTT CTT GCG TTA GTC			
1C	F	GAA ACC CAA ACC AGA GAG	255	58.0	61.0, 63.5
	R	ATA TCA CCT GCT GAA CTC AGA GTC			
2A	F	CCT CAA CAT AGT CAA TCG TTG GGC	245	58.0	58.3, 59.3
	R	ACA TGA ATA AAG ACC ATG TGG GCA			
3A	F	GAT TAT GGA TTA AGT GGT GCT TCG	375	58.0	59.3, 61.3, 62.3
	R	TGT CTC GGT ATT CAG CTC AT			
3B	F	CAT ACT GCC TAG GCC ACT GGA	337	58.0	60.9, 61.4
	R	ATT GGC GAC TGA CTG CTT AC			
3C	F	GAA TCT GGA ACT CGA ACA AA	333	58.0	59.7, 61.7
	R	CTG AGC ATC TCC TTC TGC CAT			

Denaturing HPLC Analysis

For high-throughput analysis, a 25 µl volume of PCR products from the three patients was automatically injected into the chromatograph for analysis using the WAVE® System for DHPLC analysis (Transgenomic, Omaha, NE). The DHPLC melting temperatures are listed in Table 1. For analysis of a small

number of samples, following 96-well-plate PCR, the plate was next placed in a WAVE® System programmed to automatically analyze each well at two to three melting temperatures. Approximately 3 hrs was sufficient time to analyze one individual's sample.

When abnormal chromatographic patterns were detected in the pooled samples by the high-throughput protocol, the sample was reanalyzed individually in the WAVE® System. The PCR product that showed the abnormal chromatographic pattern was then sequenced.

Direct DNA Sequencing

For direct sequencing, PCR products were purified with a QIA Quick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA) to remove unused primers and precursors. The PCR products were directly sequenced with the same forward and reverse PCR amplification primers on an ABI310 automated sequencer using BigDye chemistry according to the manufacturer's recommended protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Results

Screening of Pools of DNA in 171 Patients

Four DHPLC tracing patterns in the Exon3C region were shown in Figure 1. The upper most pattern (A) has a normal appearance, while the middle pattern (B) showed a broad shoulder, and the lower patterns (C and D) had a characteristic double peak pattern indicative of sequence variations in this

region. Sequencing analysis of samples B, C, and D revealed Thr448Pro, Pro481Ser, and Ala488Ala mutations (Table 12).

Four glaucoma-causing mutations were identified in 5 (2.9%) of 171 patients with POAG. In addition, eight polymorphisms and five synonymous codon changes were identified (Table 12). One novel missense mutation, Phe369Leu detected in exon 3 (Figure 2) was not present in 100 normal Japanese subjects. The three other missense mutations, Ile360Asn, Ala363Thr, and Thr448Pro have been reported in Japanese patients with POAG.

Table 12. MYOC mutations and polymorphisms in patients with POAG and controls

	Exon	Sequence change	Amino acid change	Frequency	
				patients	controls
Mutations	3	c.1079T>A	Ile360Asn	1/171	0/100
	3	c.1087G>A	Ala363Thr	2/171	0/100
	3	c.1105T>C	Phe369Leu*	1/171	0/100
	3	c.1342A>C	Thr448Pro	1/171	0/100
Polymorphisms	1	c.34G>C	Gly12Arg	1/171	2/100
	1	c.57G>T	Gln19His	1/171	1/100
	1	c.136C>T	Arg46Stop	1/171	1/100
	1	c.210C>T	Val70Val†	2/171	0/100
	1	c.227G>A	Arg76Lys	14/171	9/100
	1	c.369C>T	Thr123Thr	1/171	0/100
	1	c.473G>A	Arg158Gln	1/171	1/100
	2	c.811C>T	Thr204Met	0/171	1/100
	2	c.624C>G	Asp208Glu	5/171	2/100
	3	c.864C>T	Ile288Ile	1/171	0/100
	3	c.1110G>A	Pro370Pro	0/171	1/100
	3	c.1441C>T	Pro481Ser	1/171	0/100
	3	c.1464C>T	Ala488Ala	3/171	1/100

* Novel myocilin mutation; † novel myocilin polymorphism.

Screening of Individual Patients by Plate PCR followed by DHPLC

A DHPLC tracing from a patient with POAG is shown in Figure 3. In the exon3B region, an abnormal tracing indicative of sequence variation can be seen, which proved to represent a Phe369Leu mutation on direct sequencing.

Example 6 Variants in Optineurin Gene and their Association with Tumor Necrosis Factor- α (-857C>T) Polymorphisms in Japanese Patients with Glaucoma

Purpose: To investigate sequence variations in optineurin (OPTN) gene and their association with TNF- α polymorphism in Japanese patients with glaucoma.

SUBJECTS AND METHODS

Patients and Control Subjects

A total of 651 blood samples were collected at seven institutions in Japan. There were 201 POAG patients, 232 NTG patients, and 218 normal controls, and none of the subjects was related to others in this study.

DNA Extraction and PCR Conditions

Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by phenol-chloroform extraction. The 13 exonic coding regions of the OPTN gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primer sets listed in Table 13.

A 20-base GC-clamp was attached to some of the forward primers

to detect mutations in the higher melting temperature domain by DHPLC analysis. In high-throughput analysis, samples from three patients were pooled. PCR was performed with a thermal cycler (iCycler, Bio-Rad; Hercules, CA) in a total volume of 20 μ l containing: 45 ng of genomic DNA, 2 μ l GeneAmp 10^x PCR buffer II, 2 μ l of GeneAmp dNTP mix with a 2.0 mM concentration of each dNTP, 2.4 μ l of a 25 mM MgCl₂ solution; 4 pmol of each primer, and 0.1 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR conditions were;

denaturation at 95° C for 9 min, followed by 35 cycles at 95° C for 1 min, 55° to 60° C for 30 sec (Table 13), and 72° C for 1 min and 30 sec, and a final extension step at 72° C for 7 min.

Table 13. Primer sequences, PCR product sizes, and PCR annealing and DHPLC analysis temperatures

Exon		Primer Sequences (5' to 3')	PCR product size (bp)	PCR T _m (°C)	DHPLC T _m (°C)
4	F	CCAGTGGGTTTGTGGGACTCC	317	60	61.7
	R	AAAGGGATGGCATTTCCTTGCA			
5	F	GTCCACTTTCCTGGTGTGTGACT	277	55	58.7
	R	CAACATCACAATGGATCG			
6	F	AGCCTTAGTTTGATCTGTTCAATCA	293	60	57.0, 62.5
	R	GTTTCATCTTCCAGGGGAGGCT			
7	F	GC-clamp AATCCCTTGCATTCTGTTTTT	188	55	59.4, 61.4, 62.4
	R	GTGACAAGCACCCAGTGACGA			
8	F	GC-clamp GGTTACTCTCTTCTTAGTCTTTGGA	320	57	54.6, 58.5
	R	GGGTGAAGTGTATGGTATCTTAATT			
9	F	GC-clamp GCTATTTCTCTTAAAGCCAAAGAGA	242	55	57.4, 59.4
	R	CAGTGGCTGGACTACTCTCGT			
10	F	GC-clamp GTCAGATGATAATTGTACAGATAT	227	55	57.8, 59.8
	R	AATGTATATTTCAAAGGAGGATAAA			
11	F	CCACTGCGACGTAAAGGAGCA	286	60	57.5, 59.5
	R	CAAATCCGAATTCGAATCTGTATAA			
12	F	GC-clamp GGTTGGGAGGCAAGACTATAAGTT	233	60	55.5, 56.5
	R	TTCTGTTCAATTACTAGGCTATGGAA			
13	F	CAGGCAGAATTATTTCAAACCAT	264	60	58.9, 61.9
	R	CGAGAATACAGTCAGGCTGG			
14	F	GCACTACCTCCTCATCGCATAAACA	260	60	56.7, 59.7
	R	GGCCATGCTGATGTGAGCTCT			
15	F	GC-clamp GGAAGTGTCTGCTCAGTGTGTGCA	282	60	56.0, 59.0, 61.0
	R	GGTGCCTTGATTGGAATCCA			
16	F	GC-clamp CACAAGTGCCTGCAAAATGGAAGT	294	60	61.7
	R	GAGGCAAAATATTTGAGTGAAAACA			

GC-clamp: CGCCCGCCGCGCCCGCCGCGC

Denaturing HPLC Analysis

5 DHPLC analysis was performed using the WAVE® SYSTEMS (Transgenomic, Omaha, NE). For heteroduplex formation, products of each PCR (20 µl) were denatured at 95° C for 5 min and gradually cooled to 25° C. The annealed PCR products from the three mixed samples were automatically injected into a

10 DNASep® cartridge (Transgenomic, Omaha, NE).

Buffer A (Transgenomic, Omaha, NE) was made up of 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA), and Buffer B of 0.1 M TEAA and 25% acetonitrile. Analysis was carried out at a flow rate of 0.9 ml/min and the Buffer B gradient increased by 2%/min for 4.5 min. Elution of DNA fragments from the cartridge was detected by absorbance at 260 nm. The temperatures used for the analysis were selected according to the sequences of the DNA fragments. The WAVEMAKER software (v.4.1, Transgenomic, Omaha, NE) predicted the melting behavior of the DNA fragments at various temperatures. The predicted melting domains within the DNA fragment determined the temperatures for the DHPLC analysis (Table 13). When abnormal chromatographic patterns were detected in a pool of three samples, each of the three samples was re-analyzed individually in the WAVE® SYSTEM. Then, the PCR product that showed an abnormal chromatographic pattern was sequenced.

Direct DNA Sequencing

To detect mutations by direct sequencing, the PCR products were first purified with the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valenica, CA, USA) to remove unreacted primers and precursors. The sequencing reactions were then performed using the ABI PRISM BigDye Terminator (v.3.1) Cycle Sequencing Kit, according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). The data were collected by the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer and analyzed by the ABI PRISM

sequencing analysis program (v.3.7).

Genotyping OPTN c.412G>A (Thr34Thr) Polymorphism

The G to A substitution at position c.412 in exon 4 of the OPTN gene was detected by using restriction enzyme, HpyCH₄IV (New England BioLabs, Beverly, MA), with the same primers listed in Table 13 for the DHPLC analysis. The G allele sequence was cut into two fragments (188 bp + 129 bp) by HpyCH₄IV, while the A allele sequence remained intact (317 bp).

Genotyping TNF- α -857C>T Polymorphism

Genotyping the -857C>T polymorphism in the TNF- α promoter region was performed according to Kato et al. (Am J Med Genet 1999;88:301-304) using the forward primer, 5'-AAATCGAGTATGGGGACCCCCCTTAA-3', and the reverse primer, 5'-CCCCAGTGTGTGGCCATATCTTCTT-3'. The forward primer contained one nucleotide mismatch (bold and underlined), which allowed the use of the restriction enzyme, HincII (TaKaRa, Shiga, Japan). The C allele sequence was cut into two fragments (106 bp + 25 bp) by HincII, while the T allele sequence remained intact (131 bp).

Statistical Analyses

The frequencies of the genotypes and alleles in patients and controls were compared with the chi-square test and Fisher's exact test. The odds ratio and 95% confidence intervals (CI) also were calculated. The Hardy-Weinberg equilibrium for the observed frequencies was also calculated.

The clinical features were analyzed for differences associated with the genotypes using unpaired t test. Statistical analysis was performed with StatMate III (ATMS, Tokyo, Japan). A p value of <0.05 was considered to be significant.

5 RESULTS

OPTN Variants in Japanese Subjects

A total of 651 Japanese subjects were studied, and the results are presented in Table 14.

10 Table 14. OPTN variants observed in glaucoma patients and control subjects

Location	Sequence	Codon	Frequency in Subjects (%)		
	Changes	Changes	POAG	NTG	Control
Exon 4	c.386C>G	His26Asp	1 / 201 (0.5)	0 / 232 (0)	0 / 218 (0)
Exon 4	c.449-451delCTC	Leu47del	0 / 201 (0)	0 / 232 (0)	1 / 218 (0.5)
Exon 5	c.603T>A	Met98Lys	33 / 201 (16.4)	50 / 232 (21.6)	36 / 218 (16.5)
Exon 16	c.1944G>A	Arg545Gln	14 / 192 (7.3)	15 / 222 (6.8)	11 / 214 (5.1)
Exon 4	c.412G>A	Thr34Thr	69 / 201 (34.3)	74 / 232 (31.9)	52 / 218 (23.9)
Exon 4	c.421G>A	Pro37Pro	0 / 201 (0)	1 / 232 (0.4)	0 / 218 (0)
Exon 4	c.457C>T	Thr49Thr	2 / 201 (1)	0 / 232 (0)	0 / 218 (0)
Exon 16	c.2023C>T	His571His	0 / 162 (0)	0 / 193 (0)	2 / 196 (1.0)
Intron 4	c.476+15C>A		0 / 201 (0)	0 / 232 (0)	1 / 218 (0.5)
Intron 6	c.863-10G>A *		N/C†	N/C	N/C
Intron 6	c.863-5C>T *		N/C	N/C	N/C
Intron 8	c.1089+20G>A		4 / 133 (3.0)	11 / 172 (6.4)	4 / 126 (3.2)
Intron 9	c.1192+19C>T		0 / 133 (0)	4 / 172 (2.3)	3 / 130 (2.3)
Intron 11	c.1458+28G>C		1 / 133 (0.8)	4 / 172 (2.3)	0 / 157 (0)
Intron 15	c.1922+10G>A		2 / 133 (1.5)	4 / 172 (2.3)	1 / 157 (0.6)
Intron 15	c.1922+12G>C		0 / 133 (0)	1 / 172 (0.6)	0 / 157 (0)
Intron 15	c.1923-48C>A *		N/C	N/C	N/C

* Sequence variation was found by direct sequencing analysis.

† Not checked

Seventeen sequence changes were identified in the
25 glaucoma patients and control subjects. Among these, 3 were

missense changes, 1 was a deletion of one amino acid residue,
4 were synonymous codon changes, and 9 were changes in noncoding
sequences. One possible disease causing-mutation, His26Asp,
was identified in one POAG proband and her relatives with NTG,
5 and was not present in the 218 normal Japanese controls. A
deletion of Leu47 (3-bp deletion, CTC) was found in 1 control.

Four synonymous nucleotide substitutions, c.412G>A
(Thr34Thr), c.421G>A (Pro37Pro), c.457C>T (Thr49Thr), and
c.2023C>T (His571His) were found. The Thr34Thr substitution
10 was present in 69 POAG patients, 74 NTG patients, and 52
controls, and the Pro37Pro was found in 1 NTG patient. The
Thr49Thr was identified in 2 POAG patients, and the His571His
was present in 2 controls.

Distribution of OPTN Variants in Japanese Subjects

15 The Thr34Thr (c.412G>A) polymorphism was significantly
associated with POAG and NTG in both genotype frequency and
allele frequency (Table 15). The most significant association
was found in patients with POAG and controls ($P = 0.010$ in
genotype frequency and $P = 0.004$ in allele frequency). The
20 observed genotype frequencies were in agreement with those
predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium.

Table 15. Genotype distribution and allele frequency of optineurin gene polymorphisms in cases and controls

412G>A (Thr34Thr)																				
Characteristics	n	Genotype frequency (%)				p value*	Genotype frequency (%)				p value*	Genotype frequency (%)				p value	Allele frequency (%)			p value*
		G/G	G/A	A/A			G/G	G/A+A/A		G/G+G/A		A/A		G	A					
POAG	201	132 (65.7)	59 (29.3)	10 (5.0)	0.01	132 (65.7)	69 (34.3)	0.018		191 (95.0)	10 (5.0)	0.017		323 (80.3)	79 (19.7)	0.004				
NTG	232	158 (68.0)	66 (28.5)	8 (3.5)	0.062	158 (68.0)	74 (32.0)	0.058		224 (96.5)	8 (3.5)	0.107		382 (82.3)	82 (17.7)	0.027				
H-NTGq	168	112 (66.7)	48 (28.5)	8 (4.8)	0.021	112 (66.7)	56 (33.3)	0.040		160 (95.2)	8 (4.8)	0.024		272 (81.0)	64 (19.0)	0.011				
L-NTGq	64	46 (71.9)	18 (28.1)	0 (0)	0.496	46 (71.9)	18 (28.1)	0.487		64 (100)	0 (0)	1		110 (85.9)	18 (14.1)	0.617				
Control	218	166 (76.1)	50 (22.9)	2 (1.0)		166 (76.1)	52 (23.9)			216 (99.0)	2 (1.0)			382 (87.6)	54 (12.4)					

603T>A (Met98Lys)																				
Characteristics	n	Genotype frequency (%)				p value*	Genotype frequency (%)				p value*	Genotype frequency (%)				p value	Allele frequency (%)			p value*
		T/T	T/A	A/A			T/T	T/A+A/A		T/T+T/A		A/A		T	A					
POAG	201	168 (83.6)	32 (15.9)	1 (0.5)	0.998	168 (83.6)	33 (16.4)	0.979		200 (99.5)	1 (0.5)	1		368 (91.5)	34 (8.5)	0.988				
NTG	232	182 (78.4)	45 (19.4)	5 (2.2)	0.168	182 (78.4)	50 (21.6)	0.174		227 (97.8)	5 (2.2)	0.217		409 (88.1)	55 (11.9)	0.096				
H-NTGq	168	131 (78.0)	32 (19.0)	5 (3.0)	0.096	131 (77.8)	37 (22.2)	0.171		163 (97.0)	5 (3.0)	0.090		294 (87.5)	42 (12.5)	0.068				
L-NTGq	64	51 (79.7)	13 (20.3)	0 (0)	0.673	51 (79.7)	13 (20.3)	0.481		64 (100)	0 (0)	1		115 (79.7)	13 (20.3)	0.359				
Control	218	182 (83.5)	35 (16.0)	1 (0.5)		182 (83.5)	36 (16.5)			217 (99.5)	1 (0.5)			399 (91.5)	37 (8.5)					

* p value for χ^2 test.

p value for Fisher's exact test.

a H means high-ton NTG. Maximum IOP ≥ 16 mmHg.

b L means low-ton NTG. Maximum IOP ≤ 15 mmHg.

|| p < 0.05

p < 0.01

The clinical characteristics of the glaucoma patients, such as age at diagnosis, IOP at diagnosis, and visual field score at diagnosis, were examined for association with c.412G>A (Thr34Thr) and c.603T>A (Met98Lys) polymorphisms as listed in Table 16. The glaucoma patients did not show an association with the clinical characteristics for the G/G and G/A+A/A genotypes in Thr34Thr or for the T/T and T/A+A/A genotypes in Met98Lys.

Table 16. Comparison of clinical characteristics of glaucoma patients according to OPTN genotypes

c.412G>A (Thr34Thr)

	Phenotype Variable	G/G	G/A+A/A	p value*
5	POAG Age at diagnosis (ys)	53.5 ± 16.4 (n = 129)	54.5 ± 15.9 (n = 69)	0.680
	IOP at diagnosis (mm Hg)	27.5 ± 7.9 (n = 84)	26.8 ± 7.3 (n = 41)	0.608
	Visual field score at diagnosis	3.1 ± 0.9 (n = 131)	3.2 ± 1.0 (n = 68)	0.139
	NTG Age at diagnosis (ys)	57.1 ± 13.3 (n = 154)	54.5 ± 13.2 (n = 74)	0.167
	IOP at diagnosis (mm Hg)	16.7 ± 2.4 (n = 158)	16.9 ± 2.1 (n = 74)	0.539
	Visual field score at diagnosis	2.8 ± 0.7 (n = 156)	2.7 ± 0.7 (n = 74)	0.313
	H-NTG Age at diagnosis (ys)	58.4 ± 12.9 (n = 109)	54.4 ± 12.6 (n = 42)	0.117
	IOP at diagnosis (mm Hg)	18.0 ± 1.5 (n = 111)	17.8 ± 1.6 (n = 42)	0.428
	Visual field score at diagnosis	2.8 ± 0.7 (n = 111)	2.7 ± 0.7 (n = 42)	0.385

c.603T>A (Met98Lys)

	Phenotype Variable	T/T	T/A+A/A	p value*
10	POAG Age at diagnosis (ys)	53.4 ± 16.0 (n = 165)	56.2 ± 17.1 (n = 33)	0.365
	IOP at diagnosis (mm Hg)	27.2 ± 7.3 (n = 152)	27.2 ± 8.3 (n = 29)	1
	Visual field score at diagnosis	3.1 ± 0.9 (n = 166)	3.3 ± 1.0 (n = 33)	0.254
	NTG Age at diagnosis (ys)	56.3 ± 13.6 (n = 181)	56.1 ± 12.3 (n = 47)	0.927
	IOP at diagnosis (mm Hg)	16.7 ± 2.3 (n = 182)	17.0 ± 2.4 (n = 50)	0.419
	Visual field score at diagnosis	2.8 ± 0.7 (n = 181)	2.8 ± 0.6 (n = 49)	1
	H-NTG Age at diagnosis (ys)	57.3 ± 13.0 (n = 130)	57.4 ± 11.9 (n = 35)	0.967
	IOP at diagnosis (mm Hg)	17.8 ± 1.5 (n = 131)	18.1 ± 1.5 (n = 37)	0.284
	Visual field score at diagnosis	2.7 ± 0.7 (n = 130)	2.8 ± 0.4 (n = 37)	0.408

* p values for unpaired t test.

H means high-teen NTG. Maximum IOP ≥ 16 mmHg.

Association between OPTN Polymorphism and TNF-α Polymorphism in Glaucoma Patients

No significant difference in genotype or allele frequency was noted between patients and controls for the -857C>T genotype in the promoter region of the TNF-α gene (data not shown). The observed genotype frequencies were in agreement with those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium. However, among individuals with the C/T+T/T

genotype (or -857T carriers) in the TNF- α gene, 42.2% of POAG patients were OPTN/412A carriers compared to 21.6% of controls (Table 17). This difference in frequency was significant ($P = 0.009$). This association was not observed in patients who were OPTN/603A (98Lys) carriers.

Table 17. Distribution of OPTN genotypes (c.412G>A and c.603T>A) according to TNF- α genotypes (-857C>T) in glaucoma patients and controls

c.412C>A (Thr34Thr)									
Phenotype	-857C>T	C/C (%)		p value*	Odds ratio 95 % CI	C/T+T/T (%)		p value*	Odds ratio 95 % CI
	c.412G>A	G/G	G/A + A/A			G/G	G/A + A/A		
POAG	95 (69.3)	42 (30.7)	0.290	1.33 (0.79 - 2.24)	37 (37.8)	27 (42.2)	0.009 _a	2.65 (1.26 - 5.56)	
NTG	106 (66.3)	54 (33.7)	0.095	1.33 (0.93 - 2.52)	52 (72.2)	20 (27.8)	0.388	1.39 (0.63 - 2.97)	
H-NTG	75 (64.1)	42 (35.9)	0.056	1.68 (0.99 - 2.87)	37 (72.5)	14 (27.5)	0.453	1.37 (0.60 - 3.14)	
Control	108 (75.0)	36 (25.0)			58 (78.4)	16 (21.6)			

c.603T>A (Met98Lys)									
Phenotype	-857C>T	C/C (%)		p value*	Odds ratio 95 % CI	C/T+T/T (%)		p value*	Odds ratio 95 % CI
	c.603T>A	T/T	T/A + A/A			T/T	T/A + A/A		
POAG	113 (82.5)	24 (17.5)	0.729	1.12 (0.60 - 2.09)	55 (85.9)	9 (14.1)	0.575	0.77 (0.30 - 1.94)	
NTG	121 (75.6)	39 (24.4)	0.069	1.70 (0.96 - 3.01)	61 (84.7)	11 (15.3)	0.709	0.85 (0.32 - 2.04)	
H-NTG	88 (75.2)	29 (24.8)	0.076	1.73 (0.94 - 3.20)	43 (84.3)	8 (15.7)	0.782	0.87 (0.33 - 2.29)	
Control	121 (84.0)	23 (16.0)			61 (82.4)	13 (17.6)			

* p values for χ^2 test.

H means high-tension NTG. Maximum IOP ≥ 16 mmHg.

_a $p < 0.01$

In POAG patients, those who were TNF- α /-857T and OPTN/412A carriers were associated with significantly worse ($P = 0.034$) visual field scores than those who were TNF- α /-857T and non-OPTN/412A carriers (Table 18). This association was not observed in patients with H-NTG.

Table 18. Comparison of clinical characteristics of glaucoma patients according to OPTN genotypes (c.412G>A and c.603T>A) and TNF- α genotypes (-857C>T)

c.412G>A (Thr34Thr)		(TNF- α genotypes)		C/C		p value*	C/T+T/T		p value*
		(OPTN genotypes)		C/C	G/A+G/A		C/C	G/A+G/A	
POAG	Age at diagnosis (yr)	54.9 \pm 16.2 (n = 93)		57.1 \pm 13.6 (n = 42)	0.445		49.9 \pm 16.5 (n = 36)	50.5 \pm 18.2 (n = 27)	0.872
	IOP at diagnosis (mm Hg)	27.5 \pm 7.9 (n = 84)		26.8 \pm 7.3 (n = 41)	0.635		27.8 \pm 7.4 (n = 33)	26.0 \pm 5.6 (n = 23)	0.514
	Visual field score	3.1 \pm 0.9 (n = 93)		3.2 \pm 1.0 (n = 41)	0.766		2.9 \pm 0.9 (n = 33)	3.4 \pm 0.9 (n = 27)	0.034 _A
H-NTG	Age at diagnosis (yr)	58.0 \pm 13.7 (n = 73)		54.4 \pm 12.6 (n = 42)	0.163		59.4 \pm 11.1 (n = 35)	57.5 \pm 11.4 (n = 14)	0.592
	IOP at diagnosis (mm Hg)	18.0 \pm 1.5 (n = 75)		17.8 \pm 1.6 (n = 42)	0.501		17.9 \pm 1.5 (n = 36)	17.6 \pm 1.6 (n = 14)	0.836
	Visual field score	2.9 \pm 0.7 (n = 75)		2.7 \pm 0.7 (n = 42)	0.141		2.7 \pm 0.7 (n = 35)	2.6 \pm 0.5 (n = 14)	0.629

c.603T>A (Met98Lys)		(TNF- α genotypes)		C/C		p value*	C/T+T/T		p value*
		(OPTN genotypes)		T/T	T/A+T/A		T/T	T/A+T/A	
POAG	Age at diagnosis (yr)	54.9 \pm 14.7 (n = 112)		58.5 \pm 18.4 (n = 24)	0.301		50.2 \pm 14.1 (n = 34)	50.1 \pm 10.8 (n = 9)	0.987
	IOP at diagnosis (mm Hg)	27.2 \pm 7.5 (n = 106)		27.5 \pm 8.8 (n = 20)	0.874		26.4 \pm 6.8 (n = 43)	26.4 \pm 6.9 (n = 9)	1
	Visual field score	3.1 \pm 0.9 (n = 112)		3.4 \pm 0.9 (n = 24)	0.141		3.1 \pm 0.9 (n = 34)	3.1 \pm 1.1 (n = 9)	1
H-NTG	Age at diagnosis (yr)	56.8 \pm 13.6 (n = 87)		56.2 \pm 12.5 (n = 28)	0.836		54.3 \pm 11.6 (n = 43)	56.8 \pm 13.6 (n = 7)	0.758
	IOP at diagnosis (mm Hg)	17.9 \pm 1.5 (n = 88)		17.9 \pm 1.4 (n = 29)	1		17.7 \pm 1.5 (n = 43)	18.8 \pm 1.5 (n = 8)	0.063
	Visual field score	2.8 \pm 0.8 (n = 88)		2.9 \pm 0.3 (n = 29)	0.836		2.6 \pm 0.7 (n = 43)	2.8 \pm 0.4 (n = 8)	0.439

* p values for unpaired t test.

H means high-tension NTG. Mean open IOP \geq 16 mmHg.

A, p < 0.05

Example 7. Correlation between Gene Polymorphism of angiotensin II type 2 receptor and the IOP reducing effect of angiotensin II receptor blocker

Methods

Patients

X染色体上に存在する多型であるアンギオテンシン II 受容体 2 (AT2) 遺伝子の塩基番号 3123 位に C (シトシン) を持つ男性 9 名、A (アデニン) を持つ男性 4 名、CC を持つ女性 4 名、CA を持つ女性 4 名に、アンギオテンシン II 受容体拮抗薬であるカンデサルタンシレキセチルを経口投与し、投与後 1 から 2 4 時間後の眼圧の推移を測定した。

RESULTS

薬剤投与後 1 から 24 時間後の眼圧の推移について、Table 19 に示す。

Table 19.

5	眼圧下降量mmHg								遺伝子多型AT2/3123CA			
	内服前	1時間後	2時間後	3時間後	4時間後	5時間後	6時間後	24時間後	男性	男性	女性	女性
10	0	-2	-1	-3	-2	-1	-1	-1		A		
	0	-2	-2	0	0	-1	1	1		A		
	0	1	1	0	0	-2	-2	0		A		
	0	0	0	-2	1	0	0	-1	C			
	0	-1	-3	-5	-2	-3	-3	-3	C			
	0	0	-3	-2	-4	-3	0	0				CA
	0	-1	-1	-4	-3	-4	-3	1	C			
	0	-2	-4	-4	-4	-4	-5	-2	C			
	0	-2	-3	-3	-2	-2	1	2			CC	
	0	-2	-3	-2	-5	-3	-3	0	C			
15	0	-4	-6	-6	-6	-6	-4	-5	C			CA
	0	-4	-5	-6	-5	-5	-5	-7				
	0	-4	-6	-6	-8	-5	-5	-4				CA
	0	-2	-3	-6	-5	-6	-3	-3	C			
	0	-2	-4	-4	-6	-3	-4	-5				CA
	0	-4	-8	-6	-7	-6	-6	-2			CC	
	0	-4	-4	-5	-3	-5	-4	-3	C			
	0	-1	-4	-6	-3	-6	-4	0			CC	
	0	-2	-4	-7	-5	-7	-6	-3			CC	
	0	-2	-7	-6	-4	-6	-6	-1	C			
20	0	-6	-8	-8	-12	-12	-12	-12		A		

I: 眼圧下降無効例

II: 眼圧下降効果+例

III: 眼圧下降効果++例

4例中3例はA

6例中5例はCまたはCC

11例中7例はCまたはCC

すなわちAを持つと眼圧が下がり難く、Cを持つと下がりやすい

多型はX染色体

男性はCまたはAを持つ

女性はCC、CAまたはAAを持つ

AT2 遺伝子の塩基番号 3123 に A を持つ男性がアンギオテンシン II 受容体拮抗薬であるカンデサルタンシレキセチルを内服すると、75%の割合で眼圧が下がり難かったが、C を持つ男性は 100%の割合で眼圧が低下した。一方、女性の場合、CC を持つ人は 100%の割合で眼圧が低下した。

上記結果より、AT2 遺伝子多型と薬効との間に相関関係があることが示唆された。

CLAIMS

1. 生体試料において、以下に示す遺伝子多型のうち、いずれか少なくとも1つを解析する工程を含む、生体試料の遺伝子多型の検出方法。

(1) エンドセリン遺伝子：コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン

5 (2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号-1370 位がチミンまたはグアニン

(3) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子：塩基番号 70 位がシトシンまたはグアニン

10 (4) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子：塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン

(5) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子：コドン番号 323 位がヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン

(6) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン

(7) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン

15 (8) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン

(9) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン

(10) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン

(11) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子：塩基番号-713 位がチミンまたはグアニン

20 (12) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子：塩基番号-521 位がシトシンまたはチミン

(13) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子：塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン

25 (14) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子：塩基番号 1359 位がグアニンまたはアデニン

- (15) CNR1 (カンナビノイド受容体1) 遺伝子: 塩基番号 385 位がシトシンまたはアデニン
- (16) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン
- 5 (17) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がジチジンまたはセリン
- (18) CACNA1A (カルシウムチャンネル α 1A) 遺伝子多型
- (19) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 α 2) 遺伝子多型
- (20) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子: 塩基番号 190
- 10 位がグアニンまたはシトシン
- (21) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子: 塩基番号 677 位がシトシンまたはチミン
- (22) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシンまたはアルギニン
- 15 (23) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステインまたはセリン
- (24) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領域における 1G/2G
- (25) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306
- 20 位がシトシンまたはチミン
- (26) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領域における 5A/6A
- (27) BLAR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリンまたはグリシン
- 25 (28) BLAR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリ

シンまたはアルギニン

(29) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギニンまたはグリシン

(30) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレオニンまたはイソロイシン

(31) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン

(32) オプチニューリン (OPTN) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン

10 (33) TP53 遺伝子: コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン

(34) ミクロゾーム型エポキシドヒドラーゼ (EPHX1) 遺伝子: コドン番号 113 位がチロシンまたはヒスチジン

2. 以下の工程 [I] から [III] を含む、視神経症の診断方法。

[I] 生体試料において、以下に示す遺伝子多型のうち、いずれか少なくとも 1

15 つを解析する工程

(1) エンドセリン遺伝子: コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン

(2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: 塩基番号 -1370 位がチミンまたはグアニン

20 (3) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子: 塩基番号 70 位がシトシンまたはグアニン

(4) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子: 塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン

(5) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子: コドン番号 323 位がヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン

25 (6) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン

- (7) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン
- (8) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン
- (9) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン
- (10) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン
- 5 (11) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子：塩基番号-713 位がチミンまたはグアニン
- (12) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子：塩基番号-521 位がシトシンまたはチミン
- (13) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子：塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン
- 10 (14) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子：塩基番号 1359 位がグアニンまたはアデニン
- (15) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子：塩基番号 385 位がシトシンまたはアデニン
- 15 (16) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子：塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン
- (17) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子：コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン
- (18) CACNA1A (カルシウムチャンネル $\alpha 1A$) 遺伝子多型
- 20 (19) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 α 2) 遺伝子多型
- (20) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子：塩基番号 190 位がグアニンまたはシトシン
- (21) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子：塩基番号 677 位がシトシンまたはチミン
- 25 (22) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子：コドン番号 192 位がグリシン

またはアルギニン

(23) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステインまたはセリン

5 (24) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領域における 1G/2G

(25) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306 位がシトシンまたはチミン

(26) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領域における 5A/6A

10 (27) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリンまたはグリシン

(28) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリシンまたはアルギニン

15 (29) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギニンまたはグリシン

(30) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレオニンまたはイソロイシン

(31) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン

20 (32) オプチニューリン (OPTN) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン

(33) TP53 遺伝子: コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン

(34) ミクロゾーム型エポキシドヒドラーゼ (EPHX1) 遺伝子: コドン番号 113 位がチロシンまたはヒスチジン

25 [I I] 前記工程によって得られる遺伝子多型情報から生体試料の遺伝子型を

決定する工程、および

[I I I] 決定された遺伝子型から視神経症の遺伝的リスクを求める工程。

3. 視神経症が緑内障あるいはレーベル病である請求項2記載の方法。

4. 以下の工程[I]から[I I I]を含む、緑内障の診断方法。

5 (I) 生体試料において、以下に示す遺伝子多型のうち、いずれか少なくとも1つを解析する工程

(1) エンドセリン遺伝子：コドン番号198位がリジンまたはアスパラギン

(2) EDN1 (エンドセリン1) 遺伝子：塩基番号-1370位がチミンまたはグアニン

10 (3) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子：塩基番号70位がシトシンまたはグアニン

(4) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子：塩基番号1222位がシトシンまたはチミン

15 (5) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子：コドン番号323位がヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン

(6) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号9099位がシトシンまたはアデニン

(7) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号9101位がチミンまたはグアニン

(8) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号9101位がチミンまたはシトシン

(9) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号9804位がグアニンまたはアデニン

20 (10) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号11778位がグアニンからアデニン

(11) AT1 (アンギオテンシン II 受容体1) 遺伝子：塩基番号-713位がチミンまたはグアニン

(12) AT1 (アンギオテンシン II 受容体1) 遺伝子：塩基番号-521位がシトシンまたはチミン

25 (13) AT2 (アンギオテンシン II 受容体2) 遺伝子：塩基番号3123位がシ

トシンまたはアデニン

(14) CNR1 (カンナビノイド受容体1) 遺伝子: 塩基番号 1359 位がグアニンまたはアデニン

5 (15) CNR1 (カンナビノイド受容体1) 遺伝子: 塩基番号 385 位がシトシンまたはアデニン

(16) 5-HT2A (セロトニン受容体2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン

(17) 5-HT2C (セロトニン受容体2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン

10 (18) CACNA1A (カルシウムチャンネル α 1A) 遺伝子多型

(19) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ1 α 2) 遺伝子多型

(20) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン70-1) 遺伝子: 塩基番号 190 位がグアニンまたはシトシン

15 (21) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子: 塩基番号 677 位がシトシンまたはチミン

(22) PON1 (パラオキシナーゼ1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシンまたはアルギニン

(23) PON2 (パラオキシナーゼ2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステインまたはセリン

20 (24) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ1) 遺伝子のプロモーター領域における 1G/2G

(25) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ2) 遺伝子: 塩基番号-1306 位がシトシンまたはチミン

25 (26) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ3) 遺伝子のプロモーター領域における 5A/6A

(27) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリン
またはグリシン

(28) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリ
シンまたはアルギニン

5 (29) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギ
ニンまたはグリシン

(30) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレ
オニンまたはイソロイシン

10 (31) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイ
シン

(32) オプチニューリン (OPTN) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまた
はアデニン

[I I] 前記工程によって得られる遺伝子多型情報から生体試料の遺伝子型を
決定する工程、および

15 [I I I] 決定された遺伝子型から緑内障の遺伝的リスクを求める工程。

5. 工程[I]において、さらに緑内障に公知の遺伝子多型を含めて解析する
ことを含む、請求項4に記載の緑内障の診断方法。

6. 請求項4の工程[I]において、(1)、(13) および(16) ~ (19)
の遺伝子多型のいずれか少なくとも1つを解析することを特徴とする正常眼圧

20 緑内障の診断方法。

(1) エンドセリン遺伝子: コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン

(13) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシ
トシンまたはアデニン

25 (16) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンま
たはシトシン

(17) 5-HT_{2C} (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン

(18) CACNA1A (カルシウムチャンネル α 1A) 遺伝子多型

(19) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 α 2) 遺伝子多型

5 7. さらに正常眼圧緑内障に公知の遺伝子多型を含めて解析することを含む、請求項 6 に記載の緑内障の診断方法。

8. 請求項 4 の工程 [I] において、(6) ~ (8) および (11) ~ (13) のいずれか少なくとも 1 つの遺伝子多型を解析することの特徴とする高眼圧緑内障の診断方法。

10 (6) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン

(7) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン

(8) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン

(11) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-713 位がチミンまたはグアニン

15 (12) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-521 位がシトシンまたはチミン

(13) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン

9. さらに高眼圧緑内障に公知の遺伝子多型を含めて解析することを含む、

20 請求項 8 に記載の緑内障の診断方法。

10. 以下の工程 [I] から [III] を含む、レーベル病の診断方法。

[I] 生体試料において、以下に示す遺伝子多型のいずれか少なくとも 1 つを解析する工程

(33) TP53 遺伝子: コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン

25 (34) ミクロゾーム型エポキシドヒドラーゼ (EPHX1) 遺伝子: コドン番号

113 位がチロシンまたはヒスチジン

[I I] 前記工程によって得られる遺伝子多型情報から生体試料の遺伝子型を決定する工程、および

[I I I] 決定された遺伝子型からレーベル病の遺伝的リスクを求める工程。

5 11. 工程 [I] において、さらにレーベル病に公知の遺伝子多型を含めて解析することを含む、請求項 10 に記載のレーベル病の診断方法。

12. 遺伝子多型を、RFLP 法、PCR-SSCP 法、ASO ハイブリダイゼーション法、ダイレクトシーケンス法、ARMS 法、DGGE 法、RNA seA 切断法、化学切断法、DPL 法、TaqMan PCR 法、インベーター
10 法、MALDI-TOF/MS 法、TDI 法、一塩基伸長法、WAVE 法、一分子蛍光検出法からなる群から選択される一つまたは二つ以上の方法による工程であることを特徴とする、請求項 1-11 に記載の方法。

13. 以下の (1) ~ (34) からなるグループより選択される一つ以上の
15 遺伝子のプライマーまたはプローブを含む視神経症に関連した遺伝子の検出用キット。

(1) エンドセリン遺伝子：コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン

(2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号-1370 位がチミンまたはグア
ニン

(3) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子：塩基番号 70 位がシトシンまた
20 はグアニン

(4) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子：塩基番号 1222 位がシトシンま
たはチミン

(5) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子：コドン番号 323 位がヒスチジン
をコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン

25 (6) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン

- (7) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン
- (8) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン
- (9) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン
- (10) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン
- 5 (11) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子：塩基番号-713 位がチミンまたはグアニン
- (12) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子：塩基番号-521 位がシトシンまたはチミン
- (13) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子：塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン
- 10 (14) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子：塩基番号 1359 位がグアニンまたはアデニン
- (15) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子：塩基番号 385 位がシトシンまたはアデニン
- 15 (16) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子：塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン
- (17) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子：コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン
- (18) CACNA1A (カルシウムチャンネル $\alpha 1A$) 遺伝子多型
- 20 (19) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 α 2) 遺伝子多型
- (20) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子：塩基番号 190 位がグアニンまたはシトシン
- (21) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子：塩基番号 677 位がシトシンまたはチミン
- 25 (22) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子：コドン番号 192 位がグリシン

またはアルギニン

(23) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステインまたはセリン

5 (24) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領域における 1G/2G

(25) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306 位がシトシンまたはチミン

(26) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領域における 5A/6A

10 (27) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリンまたはグリシン

(28) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリシンまたはアルギニン

15 (29) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギニンまたはグリシン

(30) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレオニンまたはイソロイシン

(31) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン

20 (32) オプチニューリン (OPTN) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン

(33) TP53 遺伝子: コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン

(34) ミクロゾーム型エポキシドヒドラーゼ (EPHX1) 遺伝子: コドン番号 113 位がチロシンまたはヒスチジン

25 14. さらに視神経症関連した公知の遺伝子のプライマーまたはプローブを

含む請求項 13 に記載のキット。

15. 以下の (1) ~ (32) からなるグループより選択される一つ以上の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む縁内障に関連した遺伝子の検出用キット。

- 5 (1) エンドセリン遺伝子：コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギンをコードする遺伝子
- (2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号-1370 位がチミンまたはグアニン
- (3) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子：塩基番号 70 位がシトシンまたはグアニン
- 10 (4) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子：塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン
- (5) EDNRA (エンドセリン受容体) 遺伝子：コドン番号 323 位がヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン
- 15 (6) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン
- (7) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン
- (8) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン
- (9) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン
- (10) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン
- 20 (11) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子：塩基番号-713 位がチミンまたはグアニン
- (12) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子：塩基番号-521 位がシトシンまたはチミン
- (13) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子：塩基番号 3123 位がシ
- 25 トシンまたはアデニン

- (14) CNR1 (カンナビノイド受容体1) 遺伝子: 塩基番号 1359 位がグアニンまたはアデニン
- (15) CNR1 (カンナビノイド受容体1) 遺伝子: 塩基番号 385 位がシトシンまたはアデニン
- 5 (16) 5-HT2A (セロトニン受容体2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン
- (17) 5-HT2C (セロトニン受容体2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン
- (18) CACNA1A (カルシウムチャンネル $\alpha 1A$) 遺伝子多型
- 10 (19) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 α 2) 遺伝子多型
- (20) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子: 塩基番号 190 位がグアニンまたはシトシン
- (21) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子: 塩基番号 677 位がシトシンまたはチミン
- 15 (22) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシンまたはアルギニン
- (23) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステインまたはセリン
- (24) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領域における 1G/2G
- 20 (25) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306 位がシトシンまたはチミン
- (26) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領域における 5A/6A
- 25 (27) B1AR ($\beta 1$ アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリン

またはグリシン

(28) B1AR (β 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリシンまたはアルギニン

5 (29) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギニンまたはグリシン

(30) B2AR (β 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレオニンまたはイソロイシン

(31) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン

10 (32) オプチニューリン (OPTN) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン

16. さらに緑内障に関連した公知の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む請求項 15 に記載のキット。

15 17. 以下の (1)、(13) および (16) ~ (19) からなるグループより選択される一つ以上の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む正常眼圧緑内障に関連した遺伝子の検出用キット。

(1) エンドセリン遺伝子: コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギンをコードする遺伝子

20 (13) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン

(16) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン

(17) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン

25 (18) CACNA1A (カルシウムチャンネル α 1A) 遺伝子多型

(19) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1α2) 遺伝子多型

18. さらに正常眼圧緑内障に関連した公知の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む請求項17に記載のキット。

5 19. 以下の(6)～(8)および(11)～(13)からなるグループより選択される一つ以上の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む高眼圧緑内障に関連した遺伝子の検出用キット。

(6) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン

(7) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン

(8) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン

10 (11) AT1 (アンギオテンシン II 受容体1) 遺伝子：塩基番号-713 位がチミンまたはグアニン

(12) AT1 (アンギオテンシン II 受容体1) 遺伝子：塩基番号-521 位がシトシンまたはチミン

15 (13) AT2 (アンギオテンシン II 受容体2) 遺伝子：塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン

20. さらに高眼圧緑内障に関連した公知の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む請求項19に記載のキット。

21. 以下の(33)～(34)の遺伝子のプライマーまたはプローブを含むレーベル病に関連した遺伝子の検出用キット。

20 (33) TP53 遺伝子：コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン

(34) ミクロゾーム型エポキシドヒドラーゼ (EPHX1) 遺伝子：コドン番号 113 位がチロシンまたはヒスチジン

22. さらにレーベル病に関連した公知の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む請求項21に記載のキット。

25 23. 塩基番号 9099 位がシトシンからアデニンに変異したミトコンドリア

遺伝子。

24. 塩基番号 9101 位がチミンからグアニンに変異したミトコンドリア遺伝子。

25. コドン番号 369 位がフェニルアラニンからロイシンに変異したアミノ酸をコードするミオシリン遺伝子。

26. ミオシリン遺伝子に変異を有する対象において、正常および変異のミオシリンをブロックすることを特徴とする緑内障の処置方法。

27. RNAi 法によって、正常および変異のミオシリンをブロックすることを特徴とする請求項 26 に記載の緑内障の処置方法。

28. 視神経症に関連した遺伝子多型を解析し、解析によって得られた遺伝子型と薬剤に対する反応性、治療効果を結びつけることを特徴とする薬剤感受性の予測方法。

29. 視神経症が緑内障あるいはレーベル病である請求項 28 に記載の方法。

30. 視神経症が緑内障である請求項 29 に記載の方法。

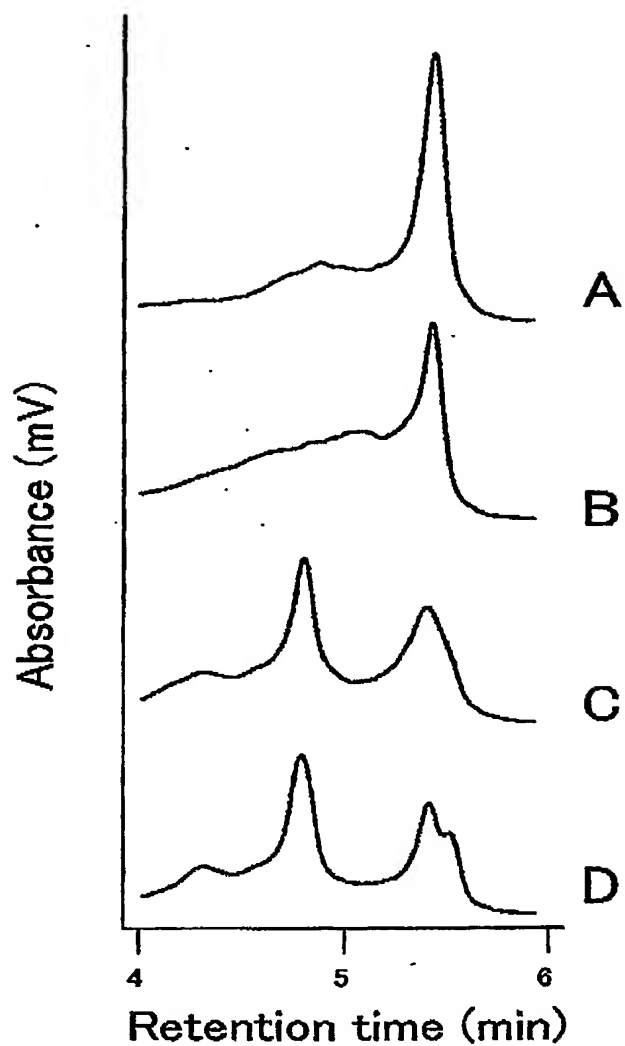
31. アンギオテンシン II 受容体 2 遺伝子の塩基番号 2123 位がシトシンまたはアデニンである遺伝子多型ことを解析することを特徴とする請求項 28 に記載の方法。

32. 薬剤がアンギオテンシン II 受容体拮抗薬である請求項 28 に記載の方法。

ABSTRACT

本発明は、視神経症、特に緑内障およびレーベル病を発症する危険因子を検出可能な危険遺伝子を用いて、視神経症の発症のリスクを判定するための、新規な診断方法および診断のためのキットを提供する。

FIG. 1



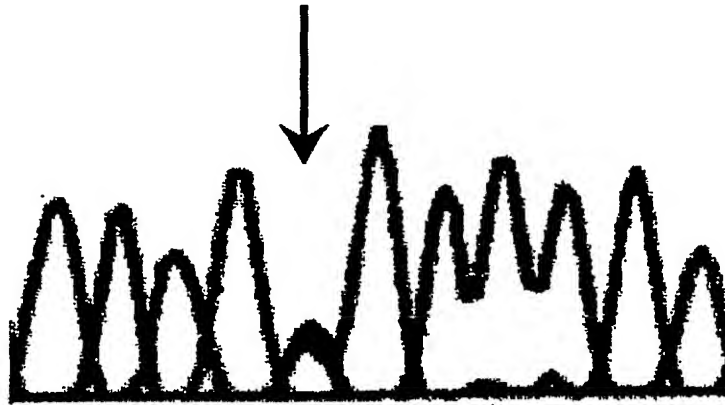
BEST AVAILABLE COPY

Yukihiki MASHIMA P80546
METHOD OF DIAGNOSIS OF OPTIC
NEUROPATHY
Filing Date: March 18, 2004
Bruce E. Kramer 202-293-7060
1 of 3

Fig. 2

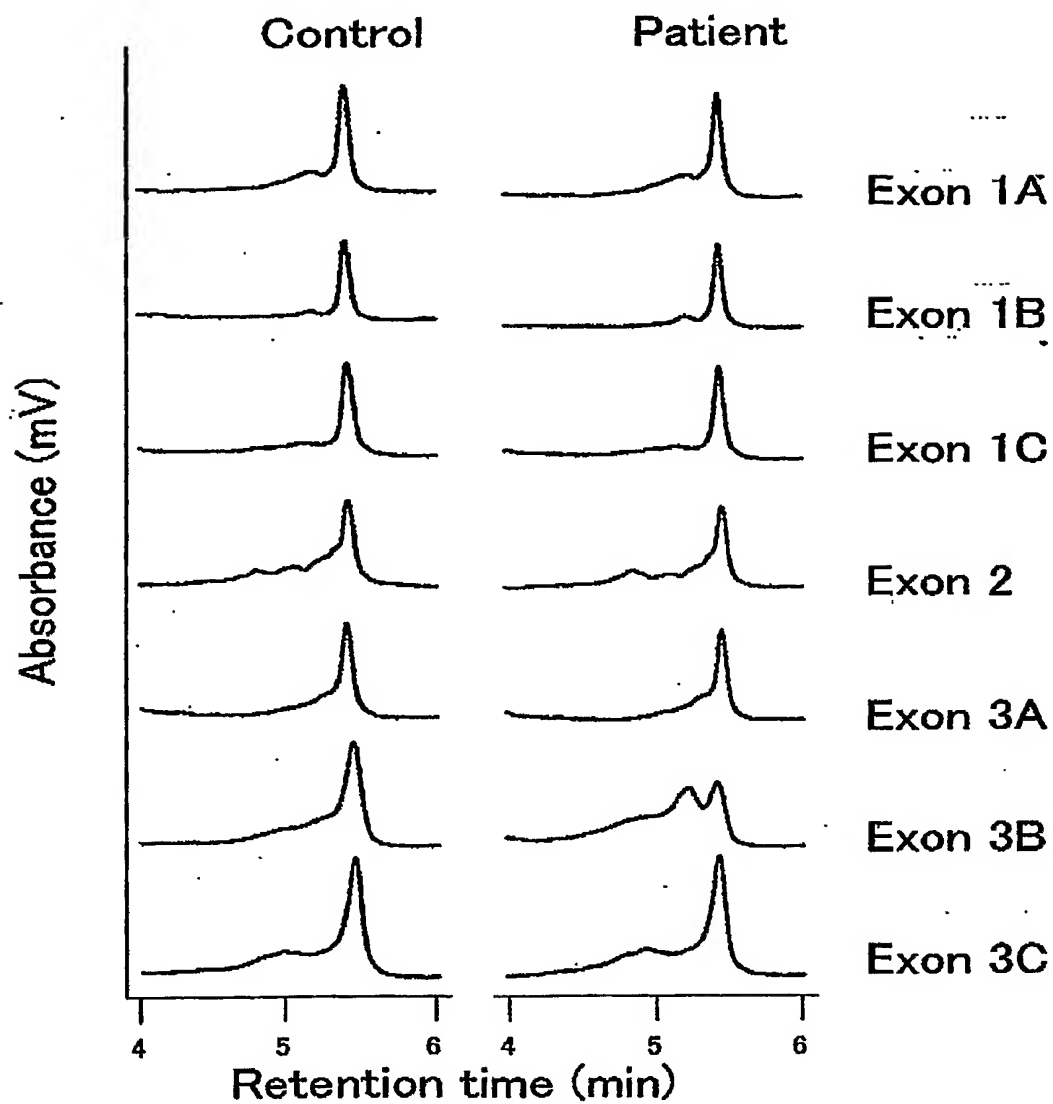
369
ACAG NTCCC GT

T/C



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 3



BEST AVAILABLE COPY